

PATENT
Attorney Docket No.: ST00005

#9
J 2/29/02

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of:

Hana KOUTNIKOVA *et al.*

Appl. No.: 09/785,548

Filed: February 20, 2001

For: COMPOSITIONS THAT CAN BE USED
FOR REGULATING THE ACTIVITY OF
PARKIN

Art Unit: 1645

Examiner: Unassigned

RECEIVED
FEB 19 2002
TECH CENTER 1600/2900

**CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §§ 119 AND 120 AND
SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT**

Commissioner for Patents
Washington DC 20231

Sir:

Applicants are enclosing herewith a certified copy of **French Patent Application No. 0001980** which was filed in France on February 17, 2000. This document provides the basis for Applicants claim for priority, which claim was made upon the filing of the above-captioned patent application in the U.S. Patent and Trademark Office on February 20, 2001.

No fee is believed necessary with this submission. However, should the U.S. Patent and Trademark Office determine that additional fees are due upon the filing of this priority document, the Commissioner is hereby authorized to charge Deposit Account No. 50-1129 for any such fees.

Respectfully submitted,
WILEY REIN & FIELDING LLP

Date: February 14, 2002

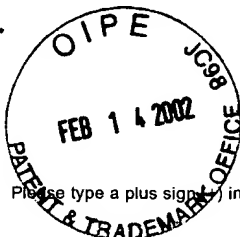
By: 

David J. Kulik Reg. No. 36,576

WILEY REIN & FIELDING LLP
Intellectual Property Department
1776 K Street, N.W.
Washington, D.C. 20006
Telephone: 202.719.7000
Facsimile: 202.719.7049
WRFMAIN 1084506.1

1000 1 07

1000 1 07



#9

Please type a plus sign (+) inside this box → ☐

PTO/SB/21 (08-00)
Approved for use through 10/31/2002. OMB 0651-0031
U.S. Patent and Trademark Office: U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

TRANSMITTAL FORM <i>(to be used for all correspondence after initial filing)</i>	Application Number	09/785,548
	Filing Date	February 20, 2001
	First Named Inventor	KOUTNIKOVA et al.
	Group Art Unit	1645
	Examiner Name	Unassigned
Total Number of Pages in This Submission	Attorney Docket Number	ST00005

RECEIVED
FEB 19 2002
TECH CENTER 1800/2000

ENCLOSURES (check all that apply)		
<input type="checkbox"/> Fee Transmittal Form <input type="checkbox"/> Fee Attached <input type="checkbox"/> Amendment / Reply <input type="checkbox"/> After Final <input type="checkbox"/> Affidavits/declaration(s) <input type="checkbox"/> Extension of Time Request <input type="checkbox"/> Express Abandonment Request <input type="checkbox"/> Information Disclosure Statement <input type="checkbox"/> Certified Copy of Priority Document(s) <input type="checkbox"/> Response to Missing Parts/Incomplete Application <input type="checkbox"/> Response to Missing Parts under 37 CFR 1.52 or 1.53	<input type="checkbox"/> Assignment Papers (for an Application) <input type="checkbox"/> Drawing(s) <input type="checkbox"/> Licensing-related Papers <input type="checkbox"/> Petition <input type="checkbox"/> Petition to Convert to a Provisional Application <input type="checkbox"/> Power of Attorney, Revocation Change of Correspondence Address <input type="checkbox"/> Terminal Disclaimer <input type="checkbox"/> Request for Refund <input type="checkbox"/> CD, Number of CD(s) _____	<input type="checkbox"/> After Allowance Communication to Group <input type="checkbox"/> Appeal Communication to Board of Appeals and Interferences <input type="checkbox"/> Appeal Communication to Group (Appeal Notice, Brief, Reply Brief) <input type="checkbox"/> Proprietary Information <input type="checkbox"/> Status Letter <input checked="" type="checkbox"/> Other Enclosure(s) (please identify below): Claim For Priority Under 35 U.S.C. ss. 119 and 120 and Submission of Certified Copy of Priority Document
Remarks		 29693 PATENT & TRADEMARK OFFICE

SIGNATURE OF APPLICANT, ATTORNEY, OR AGENT	
Firm or Individual name	David J. Kulik; Reg. No. 36,576
Signature	
Date	February 14, 2002

CERTIFICATE OF MAILING			
I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, Washington, DC 20231 on this date: _____			
Typed or printed name		_____	
Signature	_____	Date	_____

Burden Hour Statement: This form is estimated to take 0.2 hours to complete. Time will vary depending upon the needs of the individual case. Any comments on the amount of time you are required to complete this form should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, Washington, DC 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231.

10-10-1964
10-10-1964
10-10-1964



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

RECEIVED
FEB 19 2002
TECHCENTER 160012900

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 11 JAN. 2001

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30
<http://www.inpi.fr>



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa
N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

17 FEV 2000 REMISE DES PIÈCES DATE 17 INPI PARIS LIEU N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 0001980 17 FEV. 2000		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE AVENTIS PHARMA S.A. Direction Brevets 20 avenue Raymond Aron 92165 ANTONY CEDEX	
Vos références pour ce dossier (facultatif) ST00005			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date / /
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date / /
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/> N°	Date / /
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) COMPOSITIONS UTILISABLES POUR REGULER L'ACTIVITE DE LA PARKINE.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		AVENTIS PHARMA S.A.	
Prénoms			
Forme juridique		S.A.	
N° SIREN		3 . 0 . 4 . 4 . 6 . 3 . 2 . 8 . 4	
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	20 avenue Raymond Aron	
	Code postal et ville	92160	ANTONY
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		01 55 71 71 71	
N° de télécopie (facultatif)		01 47 02 50 14	
Adresse électronique (facultatif)			

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

17 FEV 2003 REMISE DES PIÈCES DATE 75 INPI PARIS LIEU N° D'ENREGISTREMENT 0001980 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réserve à l'INPI	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		ST00005	
6 MANDATAIRE			
Nom		BOUVET	
Prénom		Philippe	
Cabinet ou Société		AVENTIS PHARMA S.A.	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		PG8488	
Adresse	Rue	20 avenue Raymond Aron	
	Code postal et ville	92165	ANTONY CEDEX
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 55 71 76 92	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01 55 71 72 91	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		philippe.bouvet@aventis.com	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition.) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1	
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) RHOEN-ALCOATRE BOUCHER S.A. Fonds de Pouvoir BOUVET Philippe		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  	



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...

17 FEV 2000 REMISE DES PIÈCES DATE 75 INPI PARIS LIEU N° D'ENREGISTREMENT 0001980 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire DB 829 W / 260899		
Vos références pour ce dossier (facultatif)		ST00005		
<input type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE	Pays ou organisation			
	Date			
	Pays ou organisation			
	Date			
<input type="checkbox"/> DEMANDEUR	Nom ou dénomination sociale	INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE		
	Prénoms			
	Forme juridique			
	N° SIREN			
	Code APE-NAF			
	Adresse	Rue	101 rue de Tolbiac	
		Code postal et ville	75654 PARIS CEDEX 13	
	Pays	FRANCE		
	Nationalité	Française		
	N° de téléphone (facultatif)			
	N° de télécopie (facultatif)			
	Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> DEMANDEUR	Nom ou dénomination sociale			
	Prénoms			
	Forme juridique			
	N° SIREN			
	Code APE-NAF			
	Adresse	Rue		
		Code postal et ville		
	Pays			
	Nationalité			
	N° de téléphone (facultatif)			
	N° de télécopie (facultatif)			
	Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)	BOUVET Philippe		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

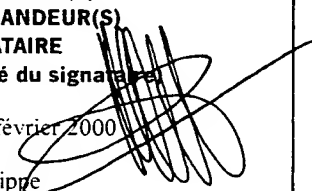
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		ST00005	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0001980	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) COMPOSITIONS UTILISABLES POUR REGULER L'ACTIVITE DE LA PARKINE			
LE(S) DEMANDEUR(S) : AVENTIS PHARMA S.A. : 20 avenue Raymond Aron - 92165 ANTONY CEDEX (FR) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE : 101 rue de Tolbiac - 75654 PARIS CEDEX 13 (FR)			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		KOUTNIKOVA	
Prénoms		Hana	
Adresse	Rue	35 rue de la Grossau	
	Code postal et ville	67100	STRASBOURG
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		BRICE	
Prénoms		Alexis	
Adresse	Rue	51 rue Saint André des Arts	
	Code postal et ville	75006	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		FOURNIER	
Prénoms		Alain	
Adresse	Rue	28 avenue Roger Salengro	
	Code postal et ville	92290	CHATENAY-MALABRY
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Antony, le 17 février 2000 BOUVET Philippe		 	

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		ST00005	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		000 1980	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) COMPOSITIONS UTILISABLES POUR REGULER L'ACTIVITE DE LA PARKINE.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : AVENTIS PHARMA S.A. : 20 avenue Raymond Aron - 92160 ANTONY (FR) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE : 101 rue de Tolbiac - 75654 PARIS CEDEX 13			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		PRADIER	
Prénoms		Laurent	
Adresse	Rue	23 avenue Cambacérès	
	Code postal et ville	91370	VERRIERES
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Antony, le 17 février 2000		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> RHONE-POULENC ROGER S.A. Fondé de Pouvoir </div>	
BOUVET Philippe			

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
p. 4, 14, 24				07.08.00	16 AOUT 2000 - V D
p. 23, 28			X	07.08.00	16 AOUT 2000 - V D
p. 29				24.08.00	29 AOUT 2000 - V D

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention « R.M. » (revendications modifiées).

COMPOSITIONS UTILISABLES POUR REGULER L'ACTIVITE
DE LA PARKINE

La présente invention concerne des compositions et méthodes utilisables pour réguler l'activité de la parkine. Elle concerne notamment une nouvelle protéine, désignée PAP1, partenaire de la parkine, ainsi que les peptides ou polypeptides dérivés ou homologues de cette protéine. Elle concerne également des composés capables de moduler au moins partiellement l'activité de la Parkine, notamment d'interférer avec l'interaction entre la parkine et PAP1. La présente invention est utilisable dans les domaines thérapeutiques, diagnostiques ou pour la constitution de cibles pharmacologiques permettant le développement de nouveaux médicaments.

Le gène de la Parkine est muté dans certaines formes familiales (juvéniles autosomiques récessives) de la maladie de Parkinson (Kitada *et al.*, 1998). La maladie de Parkinson (Lewy, 1912) est une des maladies neurodégénératives les plus communes, affectant plus de 1% de la population de plus de 55 ans. Les patients atteints de cette maladie ont des troubles neurologiques rassemblés sous le terme de syndrome parkinsonien, caractérisé par une rigidité, une bradykinésie, et un tremblement de repos. Ces symptômes sont la conséquence d'une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire du cerveau.

La plupart des cas avec une maladie de Parkinson n'ont pas d'histoire familiale. Cependant, il existe des cas familiaux dont certains correspondent à une forme monogénique de la maladie. A l'heure actuelle, seulement trois gènes différents ont été identifiés dans certaines formes héréditaires rares. La première forme correspond à une forme autosomique dominante dont le gène responsable code pour l'alpha Synucléine (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Cette protéine est un constituant abondant des inclusions intracytoplasmiques, appelées corps de Lewy, qui servent de marqueur de la maladie de Parkinson (Lewy, 1912). La seconde forme, également autosomique dominante, est liée à une mutation dans un gène codant pour une hydrolase appelée ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (Leroy *et al.*, 1998). Cette

enzyme est supposée hydrolyser les polymères ou les conjugués d'ubiquitines en monomères d'ubiquitine. La troisième forme se distingue des précédentes par une transmission autosomique récessive et un début souvent avant 40 ans ainsi que par une absence de corps de Lewy. Ces malades répondent plus favorablement à la
 5 levodopa, un précurseur de la dopamine utilisé comme traitement de la maladie de Parkinson. Le gène impliqué dans cette forme code pour une nouvelle protéine appelée Parkine (Kitada *et al.*, 1998).

Le gène de la Parkine est constitué de 12 exons couvrant une région
 10 génomique de plus de 500 000 paires de bases sur le chromosome 6 (6q25.2-q27). A l'heure actuelle, deux grands types de mutation de ce gène, à l'origine de la maladie, sont connus, soit des délétions de taille variable dans la région qui couvre les exons 2 à 9, soit des mutations ponctuelles qui produisent l'apparition prématurée d'un codon stop ou le changement d'un acide aminé (Kitada *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 1999;
 15 Lucking *et al.*, 1998; Hattori *et al.*, 1998). La nature de ces mutations et le mode de transmission autosomique récessif suggèrent une perte de fonction de la Parkine conduisant à la maladie de Parkinson.

Ce gène est exprimé dans un grand nombre de tissus et notamment dans la
 20 substance noire. Il existe plusieurs transcrits correspondant à ce gène qui proviennent d'épissages alternatifs différents (Kitada *et al.*, 1998; Sunada *et al.*, 1998). Dans le cerveau, on trouve deux types d'ARN messagers dont un est dépourvu de la partie correspondant à l'exon 5. Dans les leucocytes, des ARN messagers de la Parkine ne contenant pas la région codant pour les exons 3, 4 et 5 ont été identifiés. Le plus long
 25 des ARN messagers de la Parkine, présent dans le cerveau, contient 2960 bases et code pour une protéine de 465 acides aminés.

Cette protéine a une faible homologie dans sa partie N-terminale avec l'ubiquitine. Sa moitié C-terminale contient deux motifs « ring finger » séparés par un
 30 domaine IBR (In Between Ring) correspondant à une région riche en cystéine

pouvant lier des métaux comme les domaines « zing finger » (Morett, 1999). Par immunocytochimie, il a été montré que la Parkine est localisée dans le cytoplasme et l'appareil de Golgi de neurones de la substance noire qui contiennent de la mélanine (Shimura *et al.*, 1999). De plus, cette protéine est présente dans certains corps de
5 Lewy de Parkinsoniens. La fonction cellulaire de la Parkine n'est pas encore démontrée, mais elle pourrait jouer un rôle de transporteur dans les vésicules synaptiques, dans la maturation ou dégradation des protéines et dans le contrôle de la croissance, de la différenciation ou du développement cellulaire. Dans les formes autosomiques récessives juvéniles, la Parkine est absente, confirmant ainsi que la
10 perte de cette fonction est responsable de la maladie.

L'élucidation du rôle exact de la protéine Parkine dans le processus de dégénérescence des neurones dopaminergiques constitue donc un enjeu majeur pour la compréhension et l'approche thérapeutique de la maladie de Parkinson et plus
15 généralement des maladies du système nerveux central.

La présente invention réside dans l'identification d'un partenaire de la parkine, interagissant avec cette protéine dans des conditions physiologiques. Ce partenaire représente une nouvelle cible pharmacologique pour la fabrication ou la recherche de
20 composés capables de moduler l'activité de la parkine, notamment son activité sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques et/ou le développement de pathologies nerveuses. Cette protéine, les anticorps, les acides nucléiques correspondant ainsi que les sondes ou amorces spécifiques, sont également utilisables pour la détection ou le dosage des protéines dans des échantillons biologiques, notamment des échantillons
25 de tissu nerveux. Ces protéines ou acides nucléiques sont également utilisables dans des approches thérapeutiques, pour moduler l'activité de la parkine, ainsi que tout composé selon l'invention, capables de moduler l'interaction entre la parkine et les polypeptides de l'invention.

La présente invention résulte plus particulièrement de la mise en évidence par la demanderesse d'une nouvelle protéine humaine, désignée PAP1 (Parkine Associated Protein 1), interagissant avec la parkine. La protéine PAP1 (séquence SEQ ID NO :1 ou 2) présente une certaine homologie avec les synaptotagmines et est capable d'interagir plus particulièrement avec la région centrale de la parkine (représentée sur la séquence SEQ ID NO :3 ou 4).

La présente invention résulte également de l'identification et de la caractérisation de régions particulières de la protéine PAP1, impliquées dans la modulation de la fonction de la parkine. La mise en évidence de l'existence de cette protéine et de régions impliquées dans sa fonction permet notamment de préparer de nouveaux composés et/ou compositions utilisables comme agents pharmaceutiques et de développer des méthodes industrielles de screening de tels composés.

Un premier objet de l'invention concerne donc des composés capables de moduler, au moins partiellement, l'interaction entre la protéine PAP1 (ou ses homologues) et la parkine (notamment la parkine humaine), ou d'interférer au niveau de l'interaction entre ces protéines.

Un autre objet de l'invention réside dans la protéine PAP1, ses fragments, dérivés et homologues.

Un autre aspect de l'invention réside dans un acide nucléique codant la protéine PAP1, ses fragments, dérivés ou homologues, ainsi que tout vecteur comprenant un tel acide nucléique et toute cellule recombinante contenant un tel acide nucléique ou vecteur.

L'invention concerne aussi des anticorps capables de lier la protéine PAP1, ses fragments, dérivés et homologues, notamment des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, plus préférentiellement des anticorps capables de lier la protéine PAP1 et d'inhiber au moins partiellement son interaction avec la parkine.

Un autre aspect de l'invention concerne des sondes ou amorces nucléotidiques, spécifiques de PAP1, utilisables pour détecter ou amplifier le gène de pap1 ou une région de celui-ci dans tout échantillon biologique.

L'invention concerne encore des compositions pharmaceutiques, des méthodes de détection d'anomalies génétiques, des méthodes de production de polypeptides tels que définis ci-avant, ainsi que des méthodes de criblage ou de caractérisation de composés actifs.

5

Comme indiqué ci-avant, un premier aspect de l'invention réside dans un composé capable d'interférer, au moins partiellement, au niveau de l'interaction entre la protéine PAP1 (ou ses homologues) et la parkine.

10 Au sens de la présente invention, la dénomination protéine PAP1 désigne la protéine en soit ainsi que toutes ses formes homologues. Par forme homologue on entend désigner toutes protéines équivalentes à la protéine considérée, d'origine cellulaire diverse et notamment issue de cellules d'origine humaine, ou d'autres organismes, et possédant une activité de même type. De tels homologues
15 comprennent également les variants naturels de la protéine PAP1 de séquence SEQ ID NO2, notamment les variants polymorphiques ou d'épissage. De tels homologues peuvent être obtenus par des expériences d'hybridation entre les acides nucléiques codant (notamment l'acide nucléique de séquence SEQ ID NO:1). Au sens de l'invention, il suffit qu'une séquence de ce type présente un pourcentage d'identité
20 significatif pour conduire à un comportement physiologique assimilable à celui de la protéine PAP1 tel que revendiquée.

 L'interférence d'un composé selon l'invention peut se manifester sous différents aspects. Ainsi, le composé peut-ralentir, inhiber ou stimuler, au moins partiellement, l'interaction entre la protéine PAP1 ou l'une de ses formes homologues
25 et la Parkine. Il s'agit préférentiellement de composés capables de moduler cette interaction in vitro, par exemple dans un système de type double-hybride ou dans tout système acellulaire de détection d'une interaction entre deux polypeptides. Les composés selon l'invention sont préférentiellement des composés capables de moduler au moins partiellement cette interaction, de préférence d'augmenter ou

d'inhiber cette interaction de 20% au moins, plus préférentiellement de 50% au moins, par rapport à un contrôle en absence du composé.

Dans un mode particulier de mise en œuvre, il s'agit de composés capables d'interférer au niveau de l'interaction entre la région de la parkine représentée sur la
 5 séquence SEQ ID NO :4 et la région de la protéine PAP1 représentée sur la séquence SEQ ID NO :2.

Selon un mode particulier de l'invention, les composés sont capables de se lier au niveau du domaine d'interaction entre la protéine PAP1, ou l'une de ses formes homologues, et la Parkine.

10 Les composés selon la présente invention peuvent être de nature et d'origine variées. En particulier, il peut s'agir de composés de type peptidique, nucléique (i.e., comprenant un enchaînement de bases, notamment une molécule d'ADN ou d'ARN), lipidique, saccharidique, d'un anticorps, etc. et, plus généralement, de toute molécule organique ou inorganique.

15 Selon une première variante, les composés de l'invention sont de nature peptidique. Le terme peptidique désigne toute molécule comprenant un enchaînement d'acides aminés, tel que par exemple un peptide, un polypeptide, une protéine, un anticorps (ou fragment ou dérivé d'anticorps), le cas échéant modifié ou associé à d'autres composés ou groupements chimiques. A cet égard, le terme « peptide »
 20 désigne plus spécifiquement une molécule comprenant un enchaînement de 50 acides aminés au plus, plus préférentiellement de 40 acides aminés au plus. Un polypeptide (ou une protéine) comprend préférentiellement de 50 à 500 acides aminés, ou plus.

Selon un premier mode de mise en œuvre préféré, les composés de l'invention sont des composés peptidiques comprenant tout ou partie de la séquence peptidique
 25 SEQ ID N°2 ou un de ses dérivés, en particulier tout ou partie de la séquence peptidique de la protéine PAP1 comprenant la séquence SEQ ID N°2.

Au sens de la présente invention, le terme dérivé désigne toute séquence différant de la séquence considérée en raison d'une dégénérescence du code génétique, obtenue par une ou plusieurs modifications de nature génétique et/ou
 30 chimique, ainsi que tout peptide codé par une séquence hybridant avec la séquence

nucléique SEQ ID NO : 1 ou un fragment de celle-ci, et présentant la capacité d'interférer au niveau de l'interaction entre la protéine PAP1, ou l'un de ses homologues, et la Parkine. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. Le terme dérivé comprend également les séquences homologues à la séquence considérée, issues d'autres sources cellulaires et notamment de cellules d'origine humaine, ou d'autres organismes, et possédant une activité de même type. De telles séquences homologues peuvent être obtenues par des expériences d'hybridation. Les hybridations peuvent être réalisées à partir de banques d'acides nucléiques, en utilisant comme sonde la séquence native ou un fragment de celle-ci, dans des conditions variables d'hybridation (Maniatis *et al.*, 1989). Par ailleurs, le terme « fragment » ou « partie » désigne toute portion de la molécule considérée, comprenant au moins 5 résidus consécutifs, de préférence au moins 9 résidus consécutifs, encore plus préférentiellement au moins 15 résidus consécutifs. Des fragments typiques peuvent comprendre au moins 25 résidus consécutifs.

De tels dérivés ou fragments peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter leur efficacité thérapeutique ou de réduire leurs effets secondaires, ou celui de leur conférer de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et/ou biologiques.

En tant que peptide dérivé de la protéine PAP1 et des formes homologues, on peut citer notamment tout peptide capable d'interagir avec la Parkine, mais portant une région effectrice rendue non fonctionnelle. De tels peptides peuvent être obtenus par délétion, mutation ou disruption de cette région effectrice sur la protéine PAP1 et des formes homologues. De telles modifications peuvent être effectuées par exemple par mutagenèse *in vitro*, par introduction d'éléments additionnels ou de séquences synthétiques, ou par des délétions ou des substitutions des éléments originels. Lorsqu'un dérivé tel que défini ci-dessus est réalisé, son activité d'inhibiteur partiel de la fixation de la protéine PAP1 et des formes homologues sur son site de fixation sur

la Parkine peut être mise en évidence. Toute technique connue de l'homme de l'art peut bien évidemment être utilisée à cet effet.

Il peut également s'agir de fragments des séquences indiquées ci-dessus. De
5 tels fragments peuvent être générés de différentes façons. En particulier, ils peuvent
être synthétisés par voie chimique, sur la base des séquences données dans la présente
demande, en utilisant les synthétiseurs peptidiques connus de l'homme du métier. Ils
peuvent également être synthétisés par voie génétique, par expression dans un hôte
cellulaire d'une séquence nucléotidique codant pour le peptide recherché. Dans ce cas,
10 la séquence nucléotidique peut être préparée chimiquement en utilisant un
synthétiseur d'oligonucléotides, sur la base de la séquence peptidique donnée dans la
présente demande et du code génétique. La séquence nucléotidique peut également
être préparée à partir des séquences données dans la présente demande, par coupures
enzymatiques, ligature, clonage, etc, selon les techniques connues de l'homme du
15 métier, ou par criblage de banques d'ADN avec des sondes élaborées à partir de ces
séquences.

Par ailleurs, les peptides de l'invention à savoir capables de moduler au moins
partiellement l'interaction entre la protéine PAP1 et des formes homologues et la
20 Parkine peuvent également être des peptides ayant une séquence correspondant au site
d'interaction de la protéine PAP1 et des formes homologues sur la Parkine.

D'autres peptides selon l'invention sont les peptides capables d'entrer en
compétition avec les peptides définis ci-dessus pour l'interaction avec leur cible
25 cellulaire. De tels peptides peuvent être synthétisés notamment sur la base de la
séquence du peptide considéré, et leur capacité à entrer en compétition avec les
peptides définis ci-dessus peut être déterminée.

Un objet spécifique de la présente invention concerne la protéine PAP1. Il s'agit plus particulièrement de la protéine PAP1 comprenant la séquence SEQ ID NO :2 ou un fragment ou dérivé de celle-ci.

5 Un autre objet de l'invention réside dans des anticorps ou fragments ou dérivés d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre un polypeptide tel que défini ci-avant. De tels anticorps peuvent être générés par des méthodes connues de l'homme du métier. En particulier, ces anticorps peuvent être préparés par immunisation d'un animal contre un composé peptidique de l'invention (notamment un polypeptide ou
10 un peptide comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID NO :2), prélèvement du sang, et isolement des anticorps. Ces anticorps peuvent également être générés par préparation d'hybridomes selon les techniques connues de l'homme de l'art.

Plus préférentiellement, les anticorps ou fragments d'anticorps de l'invention
15 présentent la capacité de moduler au moins partiellement l'interaction des peptides revendiqués avec la Parkine.

Par ailleurs, ces anticorps peuvent également être utilisés pour détecter et/ou doser l'expression de la PAP1 dans des échantillons biologiques, et de ce fait, pour renseigner sur son état d'activation.
20

Les fragments ou dérivés d'anticorps sont par exemple des fragments Fab, Fab'2, des anticorps simple-chaîne (ScFv), etc. Il s'agit notamment de tout fragment ou dérivé conservant la spécificité antigénique des anticorps dont ils sont issus.

Les anticorps selon l'invention sont plus préférentiellement capables de lier
25 les protéines PAP1 comprenant la séquence SEQ ID NO :2, notamment la région de cette protéine impliquée dans l'interaction avec la parkine. Ces anticorps (ou fragments ou dérivés) sont plus préférentiellement capables de lier un épitope présent dans la séquence comprise entre les résidus 1 et 344 de la séquence SEQ ID NO :2.

L'invention concerne également les composés non peptidiques ou non exclusivement peptidiques utilisables comme agent pharmaceutique. Il est en effet possible, à partir des motifs protéiques actifs décrits dans la présente demande, de réaliser des molécules modulatrices de l'activité de PAP1 non exclusivement
5 peptidiques et compatibles avec une utilisation pharmaceutique, en particulier en dupliquant les motifs actifs des peptides avec une structure non peptidique ou de nature non exclusivement peptidique.

La présente invention a également pour objet tout acide nucléique
10 codant pour un composé peptidique selon l'invention. Il peut s'agir en particulier d'un acide nucléique comprenant tout ou partie de la séquence présentée en SEQ ID N°1 ou un de ses dérivés. Par séquence dérivée, on entend au sens de la présente invention toute séquence hybridant avec la séquence présentée en SEQ ID N°1 ou avec un fragment de celle-ci et codant pour un composé peptidique selon l'invention, ainsi que
15 les séquences résultant de ces dernières par dégénérescence du code génétique. Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences génomiques, d'ADNc, d'ARN, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces séquences peuvent être obtenues soit par criblage de banques d'ADN (banque d'ADNc, banque d'ADN
20 génomique), soit par synthèse chimique, soit par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques, soit par recherche d'homologie dans des bases de données nucléiques ou protéiques. L'hybridation mentionnée ci-dessus est préférentiellement réalisée dans les conditions décrites par Sambrook et al (1989, pages 9.52-9.55).

25 Un acide nucléique particulier au sens de l'invention code pour un polypeptide comprenant la séquence SEQ ID NO :2 ou un fragment ou dérivé de celle-ci, notamment pour la protéine PAP1 humaine. Il s'agit avantageusement d'un acide nucléique comprenant la séquence nucléique SEQ ID NO :1.

De tels acides nucléiques peuvent être utilisés pour la production des composés peptidiques de l'invention. La présente demande concerne ainsi un procédé de préparation de tels composés peptidiques selon lequel on cultive une cellule contenant un acide nucléique selon l'invention, dans des conditions d'expression dudit
5 acide nucléique et on récupère le composé peptidique produit. Dans ce cas, la partie codant pour ledit composé peptidique est généralement placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire. Le choix de ces signaux (promoteurs, terminateurs, séquence "leader" de sécrétion, etc) peut varier en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. Par ailleurs, les acides nucléiques de l'invention peuvent
10 faire partie d'un vecteur qui peut être à réplication autonome ou intégratif. Plus particulièrement, des vecteurs à réplication autonome peuvent être préparés en utilisant des séquences à réplication autonome chez l'hôte choisi. S'agissant des vecteurs intégratifs, ceux-ci peuvent être préparés par exemple en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par
15 recombinaison homologue, l'intégration du vecteur. Il peut s'agir d'un vecteur de type plasmidique, épisomique, chromosomique, viral, etc.

Les hôtes cellulaires utilisables pour la production des composés peptidiques de l'invention par voie recombinante sont aussi bien des hôtes eucaryotes que procaryotes. Parmi les hôtes eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules
20 animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, C127, PC12 etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme hôtes procaryotes, on
25 préfère utiliser les bactéries suivantes *E. coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*.

Les acides nucléiques selon l'invention peuvent également servir à la réalisation d'oligonucléotides antisens ou d'antisens génétiques utilisables comme agents pharmaceutiques. Les séquences antisens sont des oligonucléotides de petite
30 taille, complémentaire du brin codant d'un gène donné, et de ce fait capables

d'hybrider spécifiquement avec l'ARNm transcrit, inhibant sa traduction en protéine. L'invention a ainsi pour objet les séquences antisens capables d'inhiber au moins partiellement l'interaction des protéines PAP1 sur la Parkine. De telles séquences peuvent être constituées par tout ou partie des séquences nucléiques définies ci-avant.

5 Il s'agit généralement de séquences ou de fragments de séquences complémentaires de séquences codant pour des peptides interagissant avec la Parkine. De tels oligonucléotides peuvent être obtenus par fragmentation, etc, ou par synthèse chimique.

10 Les séquences revendiquées peuvent être utilisées dans le cadre de thérapies géniques, pour le transfert et l'expression *in vivo* de séquences antisens ou de peptides capables de moduler l'interaction de la protéine PAP1 avec la Parkine. A cet égard, les séquences peuvent être incorporées dans des vecteurs viraux ou non viraux, permettant leur administration *in vivo* (Kahn *et al.*, 1991). A titre de vecteurs viraux
15 conformes à l'invention on peut tout particulièrement citer les vecteurs de type adénovirus, rétrovirus, virus associé à l'adénovirus (AAV) ou virus de l'herpès. La présente demande a également pour objet des virus recombinants défectifs comprenant un acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention, notamment un polypeptide ou peptide comprenant tout ou partie de la séquence SEQ
20 ID NO :2 ou d'un dérivé de celle-ci.

L'invention permet également la réalisation de sondes nucléotidiques, synthétiques ou non, capables de s'hybrider avec les séquences nucléotidiques définies ci-avant ou leur brin complémentaire. De telles sondes peuvent être utilisées
25 *in vitro* comme outil de diagnostic, pour la détection de l'expression ou surexpression de PAP1, ou encore pour la mise en évidence d'anomalies génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations ponctuelles, etc). Ces sondes peuvent également être utilisées pour la mise en évidence et l'isolement de séquences d'acides nucléiques homologues codant pour des peptides tels que définis précédemment, à partir d'autres
30 sources cellulaires et préférentiellement de cellules d'origines humaines. Les sondes

de l'invention comportent généralement au moins 10 bases, et elles peuvent par exemple comporter jusqu'à l'intégralité d'une des séquences précitées ou de leur brin complémentaire. Préférentiellement, ces sondes sont marquées préalablement à leur utilisation. Pour cela, différentes techniques connues de l'homme du métier peuvent
5 être employées (marquage radioactif, fluorescent, enzymatique, chimique, etc).

L'invention a encore pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un composé tel que défini ci-dessus, notamment un composé peptidique.

10 Elle a notamment pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un anticorps et/ou un fragment d'anticorps tel que défini ci-dessus, ainsi que toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un acide nucléique ou un vecteur tel que défini ci-dessus.

Elle a également pour objet toute composition pharmaceutique comprenant
15 comme principe actif une molécule chimique capable d'augmenter ou de diminuer l'interaction entre la protéine PAP1 et la Parkine.

Par ailleurs, elle a aussi pour objet les compositions pharmaceutiques dans lesquelles les peptides, anticorps, molécules chimiques et séquences nucléotidiques définis ci-dessus sont associés entre-eux ou avec d'autres principes actifs.

20 Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être utilisées pour moduler l'activité de la protéine Parkine et de ce fait maintenir la survie des neurones dopaminergiques. Plus particulièrement, ces compositions pharmaceutiques sont destinées à moduler l'interaction entre la protéine PAP1 et la Parkine. Il s'agit
25 plus préférentiellement de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de maladies du système nerveux central comme par exemple la maladie de Parkinson.

L'invention a encore pour objet l'utilisation des molécules décrites ci-avant pour moduler l'activité de la Parkine ou le typage de maladies du système nerveux

central. En particulier, l'invention concerne l'utilisation de ces molécules pour moduler au moins partiellement l'activité de la Parkine.

5 L'invention concerne également un procédé pour le screening ou la caractérisation de molécules actives sur la fonction de la parkine, comprenant la sélection de molécules capables de lier la séquence SEQ ID NO :2 ou la séquence SEQ ID NO :4, ou un fragment (ou dérivé) de celles-ci. Le procédé comprend avantageusement la mise en contact, in vitro, de la ou des molécules test avec un polypeptide comprenant la séquence SEQ ID NO :2 ou la séquence SEQ ID NO :4, ou
10 un fragment (ou dérivé) de celles-ci, et la sélection de molécules capables de lier la séquence SEQ ID NO :2 (notamment la région comprise entre les résidus 1 et 344) ou la séquence SEQ ID NO :4. Les molécules testées peuvent être de nature variée (peptide, nucléique, lipide, sucre, etc., ou des mélanges de telles molécules, par exemple des bibliothèques combinatoires, etc.). Comme indiqué ci-avant, les
15 molécules ainsi identifiées peuvent être utilisées pour moduler l'activité de la protéine Parkine, et représentent des agents thérapeutiques potentiels pour le traitement de pathologies neurodégénératives.

D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des
20 exemples et figure qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LEGENDES DE LA FIGURE :

25 Figure 1: Représentation du vecteur pLex9-Parkine (135-290)

MATERIELS ET TECHNIQUES MIS EN OEUVRE

1) Souches de levure:

5 réponse LexA contrôlant l'expression des gènes rapporteurs *LacZ* et *His3*.

Elle a été cultivée sur les milieux de culture suivants:.

Milieu YPD complet :

- Extrait de levures (10 g/l) (Difco)
- Bactopeptone (20 g/l) (Difco)
- Glucose (20 g/l) (Merck)

10 Ce milieu a été rendu solide par addition de 20 g/l d'agar (Difco).

Milieu YNB minimum : -Yeast Nitrogen Base (sans acides aminés) (6,7 g/l)
(Difco)

- Glucose (20 g/l) (Merck)

15 Ce milieu peut être rendu solide par addition de 20 g/l d'agar (Difco). Il peut également être supplémenté en acides aminés et/ou en 3-amino-1,2,4-triazole par addition de milieux CSM [CSM -Leu, -Trp, -His (620 mg/l), CSM -Trp (740 mg/l) ou CSM -Leu, -Trp (640 mg/l)(Bio101)] et/ou de 3-amino-1,2,4-triazole 2,5 mM.

20 **2) Souches de bactéries:**

La souche TG1 d'*Escherichia coli*, de génotype supE, hsdΔ5, thi, Δ(lac-proAB), F'[tra D36 pro A⁺B⁺ lacI^q lacZΔM15], a été employée pour la construction de plasmides, comme moyen d'amplification et d'isolement de plasmides recombinants utilisés. Elle a été cultivée sur le milieu suivant :

[illegible]

Ce milieu est rendu solide par addition de 15 g/l d'agar (Difco).

L'ampicilline a été utilisée à 100 µg/ml, cet antibiotique sert à sélectionner les bactéries ayant reçu les plasmides portant comme marqueur le gène de résistance à cet antibiotique.

La souche HB101 d'*Escherichia coli* de génotype supE44, ara14, galK2, lacY1, Δ(gpt-proA)62, rpsL20(Str^r), xyl-5, mtl-1, recA13, Δ(mcrC-mrr), HsdS⁻(r⁻m⁻) a été employée comme moyen d'amplification et d'isolement de plasmides provenant de la banque d'ADNc de lymphocyte humain.

Elle a été cultivée sur

Milieu M9: -Na₂HPO₄ (7 g/l) (Prolabo)

10 -KH₂PO₄ (3 g/l) (Prolabo)

-NH₄Cl (1 g/l) (Prolabo)

-NaCl (0,5 g/l) (Prolabo)

-Glucose (20 g/l) (Sigma)

-MgSO₄ (1 mM) (Prolabo)

15 -Thiamine (0,001 %) (Sigma)

Ce milieu est rendu solide par addition de 15 g/l d'agar (Difco).

De la leucine (50 mg/l) (Sigma) et de la proline (50 mg/l) (Sigma) doivent être ajoutées au milieu M9 pour permettre la croissance de la souche HB101.

Lors de la sélection de plasmides provenant de la banque deux hybrides d'ADNc de lymphocyte, la leucine n'a pas été ajoutée au milieu car les plasmides portent un marqueur de sélection Leu2.

3) Plasmides :

Le vecteur pLex9 (pBTM116) (Bartel *et al.*, 1993) de 5kb homologue au pGBT10 qui contient un site multiple de clonage situé en aval de la séquence codant pour le répresseur bactérien LexA et en amont d'un terminateur pour former une protéine de fusion.

pLex-HaRasVal12, plasmide pLex9, tel que décrit dans la demande WO98/21327, qui contient la séquence codant pour la protéine HaRas mutée en position Val12 connue pour interagir avec la protéine Raf de mammifère (Vojtek *et*

al., 1993). Ce plasmide a été utilisé pour tester la spécificité d'interaction de la protéine PAP1 dans la souche L40.

pLex9-cAPP, plasmide pLex9 qui contient la séquence codant pour le domaine cytoplasmique de la protéine APP connue pour interagir avec le domaine PTB2 de FE65. Ce plasmide a été utilisé pour tester la spécificité d'interaction de la protéine PAP1 dans la souche L40.

4) Oligonucléotides de synthèse:

TTAAGAATTC GGAAGTCCAG CAGGTAG (SEQ ID N°5)
 10 ATTAGGATCC CTACACACAA GGCAGGGAG (SEQ ID N°6)
 Oligonucléotides qui ont permis d'obtenir le fragment PCR correspondant à la région centrale de la Parkine bordée par les sites *EcoRI* et *BamHI*.

GCGTTTGGAA TCACTACAG (SEQ ID N°7)
 15 GGTCTCGGTG TGGCATC (SEQ ID N°8)
 CCGCTTGCTT GGAGGAAC (SEQ ID N°9)
 CGTATTTCTC CGCCTTGG (SEQ ID N°10)
 AATAGCTCGA GTCAGTGCAG GACAAGAG (SEQ ID N°11)

Oligonucléotides qui ont servi à séquencer l'insert correspondant au gène PAP1.

20

Les oligonucléotides sont synthétisés sur l'appareil Applied System ABI 394-08. Ils sont décrochés de la matrice de synthèse par de l'ammoniac et précipités deux fois par 10 volumes de n-butanol puis repris dans de l'eau. La quantification est effectuée par mesure de la densité optique (1DO_{260} correspond à $30\text{ }\mu\text{g/ml}$).

25

5) Préparation des ADN plasmidiques.

Les préparations en petite quantité et en grande quantité d'ADN plasmidique ont été effectuées selon les protocoles recommandés par le fabricant Quiagen des kits de purification d'ADN :

- Quiaprep Spin Miniprep kit, ref : 27106
- Quiaprep Plasmid Maxiprep kit, ref : 12163.

6) Amplification enzymatique d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) :

5 Les réactions de PCR sont effectuées dans un volume final de 100µl en présence de la matrice d'ADN, de dNTP (0,2 mM), de tampon PCR (Tris-HCl pH 8,5 10 mM, MgCl₂ 1 mM, KCl 5 mM, gélatine 0,01%), de 10-20 pmoles de chacun des oligonucléotides et de 2,5 UI d'Ampli Taq DNA polymérase (Perkin Elmer). Le mélange est recouvert de 2 gouttes d'huile de paraffine pour limiter l'évaporation de
10 l'échantillon. L'appareil utilisé est le "Crocodile II" d'Appligene.

Nous avons utilisé une température de dénaturation de la matrice de 94°C, une température d'hybridation de 52°C et une température d'élongation par l'enzyme à 72°C.

15 7) Les ligatures :

Toutes les réactions de ligation sont effectuées à 37°C pendant une heure dans un volume final de 20 µl en présence de 100 à 200 ng de vecteur, 0,1 à 0,5 µg d'insert, 40 UI d'enzyme T4 DNA ligase (Biolabs) et un tampon de ligation (Tris-HCl 50 mM pH 7,8; MgCl₂ 10 mM; DTT 10 mM; ATP 1 mM). Le témoin négatif est
20 constitué par la ligation du vecteur en l'absence d'insert.

8) Transformation des bactéries :

La transformation des bactéries par un plasmide est effectuée selon le protocole suivant : 10µl du volume de ligation est utilisée pour transformer les bactéries TGI
25 selon la méthode la méthode de Chung (Chung *et al.*, 1989). Après transformation les bactéries sont étalées sur un milieu LB + ampicilline et incubées 16h à 37°C.

9) Séparation et extraction des ADN:

La séparation des ADN est réalisée en fonction de leur taille par
30 électrophorèse sur gel d'agarose selon Maniatis (Maniatis *et al.*, 1989) : gel d'agarose

à 1% (Gibco BRL) dans un tampon TBE (Tris base 90 mM; Borate 90 mM; EDTA 2 mM)

10) Séquençage fluorescent des ADN plasmidiques :

5 La technique de séquençage utilisée est dérivée de la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) et adaptée pour le séquençage par fluorescence développé par Applied Biosystems. Le protocole utilisé est celui décrit par les concepteurs du système (Perkin Elmer, 1997).

10 11) Transformation de la levure:

Les plasmides sont introduits dans la levure par une technique classique de transformation de la levure mise au point par Gietz (Gietz *et al.*, 1992) et modifiée de la façon suivante :

15 Dans le cas particulier de la transformation de la levure par la banque d'ADNc de lymphocyte, la levure utilisée contient le plasmide pLex9-Parkine (135-290) codant pour la partie centrale de la Parkine fusionnée à la protéine LexA. Elle est cultivée dans 200 ml de milieu minimum YNB supplémenté en acides aminés CSM - Trp à 30°C sous agitation jusqu'à une densité de 10^7 cellules/ml. Pour effectuer la transformation des levures suivant le protocole précédant, la suspension cellulaire a
20 été séparée en 10 tubes de 50µl dans lesquels 5µg de la banque ont été ajoutés. Le choc thermique a été effectué pendant 20 minutes puis les cellules ont été collectées par centrifugation et resuspendues dans 100 ml de milieu YPD pendant 1h à 30°C et dans 100 ml de milieu YNB supplémenté en CSM -Leu, -Trp pendant 3h30 à 30°C. L'efficacité de la transformation est déterminée en étalant différentes dilutions de
25 cellules transformées sur milieu YNB solide supplémenté en CSM -Trp, -Leu. Après une culture à 30°C durant 3 jours les colonies obtenues ont été comptées et le taux de transformation par µg d'ADN de la banque de lymphocyte a été déterminé.

12) Isolement de plasmides extrait de levure :

5 ml d'une culture de levure incubée 16h à 30°C sont centrifugés et repris dans 200 µl d'un tampon de lyse (Sorbitol 1M, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1M pH7,4, zymolyase 12,5 mg/ml) et incubés 1h à 37°C. Le lysat est ensuite traité selon le protocole recommandé par le fabricant Quiagen du kit de purification d'ADN, Quiaprep Spin
 5 Miniprep kit, ref 27106.

13) Test d'activité de la β -galactosidase :

Une feuille de nitrocellulose est préalablement déposée sur la boîte de Pétri contenant les clones de levures individualisés. Cette feuille est ensuite plongée dans
 10 de l'azote liquide pendant 30 secondes afin de faire éclater les levures et de libérer ainsi l'activité β -galactosidase. Après décongélation, la feuille de nitrocellulose est déposée, colonies vers le haut, dans une autre boîte de Pétri contenant un papier Whatman préalablement imbibé de 1,5 ml de solution PBS (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM, pH7) contenant 15 µl de X-Gal (5-
 15 bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactoside) à 40 mg/ml de N,N-diméthylformamide. La boîte est ensuite placée dans une étuve à 37°C. Le test est dit positif lorsque les colonies virent au bleu sur la membrane au bout de 12 heures.

20 **EXEMPLE 1: CONSTRUCTION D'UN VECTEUR PERMETTANT L'EXPRESSION D'UNE PROTEINE DE FUSION ENTRE LA PARTIE CENTRALE DE LA PARKINE ET LE REPRESSEUR BACTERIEN LEXA.**

Le criblage d'une banque utilisant le système double hybride nécessite que la
 25 région centrale de la Parkine soit fusionnée à une protéine liant l'ADN comme le répresseur bactérien LexA. L'expression de cette protéine de fusion est réalisée grâce au vecteur pLex9 (cf. matériels et méthodes), dans lequel a été introduite, dans le même cadre de lecture que la séquence correspondant à la protéine LexA, la séquence codant pour la région centrale de la Parkine figurant dans la séquence présentée en
 30 SEQ ID N°3 ou 4.

Le fragment d'ADN de 468 pb correspondant aux 156 acides aminés de la région centrale de la Parkine qui commence à l'acide aminé 135 a été obtenu par PCR à partir des oligonucléotides (SEQ ID N°5 et N°6) qui ont également permis d'introduire le site *EcoRI* à l'extrémité 5' et un codon stop et un site *BamHI* à l'extrémité 3'. Le fragment de PCR a été introduit entre les sites *EcoRI* et *BamHI* du multisite de clonage du plasmide pLex9 en aval de la séquence codant pour la protéine LexA pour donner le vecteur pLex9-Parkine (135-290) (Fig.1).

La construction a été vérifiée par séquençage de l'ADN. Cette vérification a permis de montrer que ce fragment ne présentait pas de mutations générées au cours de la réaction de PCR et qu'il était fusionné dans la même phase ouverte de lecture que celle du fragment correspondant à LexA.

EXEMPLE 2: CRIBLAGE D'UNE BANQUE DE FUSION DE LYMPHOCYTE.

15

Nous avons utilisé la méthode du Double-Hybride (Fields et Song, 1989).

Le criblage d'une banque de fusion permet d'identifier des clones produisant des protéines fusionnées au domaine transactivateur de GAL4, pouvant interagir avec la protéine d'intérêt décrite dans l'exemple 1 (région centrale de la parkine). Cette interaction permet de reconstituer un transactivateur qui va alors être capable d'induire l'expression des gènes rapporteurs His3 et *LacZ* dans la souche L40.

Pour effectuer ce criblage nous avons choisi une banque de fusion réalisée à partir d'ADNc provenant de lymphocytes humains périphériques fournie par Richard Benarous (Peytavi *et al.*, 1999). Des levures ont été transformées par la banque de lymphocytes et des clones positifs ont été sélectionnés comme décrit ci-après.

Lors du criblage il est nécessaire de préserver la probabilité que chaque plasmide indépendant de la banque de fusion soit présent dans au moins une levure en même temps que le plasmide pLex9-Parkine (135-290). Pour préserver cette probabilité il est important d'avoir une bonne efficacité de transformation de la levure. Pour cela nous avons choisi un protocole de transformation de la levure

30

donnant une efficacité de $2,6 \cdot 10^5$ cellules transformées par μg d'ADN. De plus comme la cotransformation de la levure par deux plasmides différents réduit cette efficacité, nous avons préféré utiliser une levure préalablement transformée par le plasmide pLex9-Parkine (135-290). Cette souche L40 pLex9-Parkine (135-290) de
 5 phénotype His⁻, Lys⁻, Leu⁻, Adé⁻ a été transformée par 50 μg d'ADN plasmidique de la banque de fusion. Cette quantité d'ADN nous a permis d'obtenir après estimation $1,3 \cdot 10^7$ cellules transformées, ce qui correspond à un nombre légèrement supérieur au nombre de plasmides indépendants qui constituent la banque. D'après ce résultat nous pouvons penser que la quasi totalité des plasmides de la banque a servi à transformer
 10 les levures. La sélection des cellules transformées, capables de reconstituer un transactivateur fonctionnel, a été faite sur un milieu YNB supplémenté avec 2,5 mM 3-amino-1,2,4-triazole et 620 mg/l de CSM (Bio101) ne contenant pas d'histidine de leucine et de tryptophane.

A l'issue de cette sélection, de nombreux clones avec un phénotype His⁺ ont
 15 été obtenus. Sur ces transformants un test d'activité β -galactosidase a été effectué afin de valider par l'expression de l'autre gène rapporteur, *LacZ*, ce nombre de clones obtenus. 115 clones présentaient le double phénotype His⁺, β -Gal⁺ pouvant correspondre à une interaction protéine-protéine.

20

EXEMPLE 3: ISOLEMENT DES PLASMIDES DE LA BANQUE DANS LES CLONES SELECTIONNES.

Afin d'identifier les protéines pouvant interagir avec la région centrale de la
 25 Parkine, les plasmides de la banque de fusion contenus dans les levures sélectionnées lors du criblage double hybride ont été extraits. Pour pouvoir en obtenir en grande quantité, cet isolement nécessite au préalable une transformation d'*E.coli* par un extrait d'ADN des souches de levures positives. Comme le plasmide de la banque contenu dans cet extrait est un plasmide navette levure/*E.coli* il peut facilement se
 30 répliquer chez la bactérie. Le plasmide de la banque a été sélectionné par

complémentation de la bactérie HB101 auxotrophe pour la leucine sur milieu dépourvu de leucine.

Les ADN plasmidiques des colonies bactériennes obtenues après transformation par des extraits d'ADN de levures ont été analysés par digestion avec
5 des enzymes de restriction et séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose. Parmi les 115 clones analysés, un clone contenant un plasmide de la banque présentant un profil différent des autres a été obtenu. Ce plasmide, appelé pGAD-Ly111b, a été plus précisément étudié.

10

EXEMPLE 4: DETERMINATION DE LA SEQUENCE DE L'INSERT CONTENU DANS LE PLASMIDE IDENTIFIE.

Le séquençage de l'insert contenu dans le plasmide identifié a été réalisé dans
15 un premier temps à partir de l'oligonucléotide SEQ ID N°7 complémentaire de la séquence de GAL4TA à proximité du site *EcoRI* d'insertion de la banque de cDNA de lymphocytes. Puis dans un deuxième temps à partir des oligonucléotides SEQ ID N°8 à SEQ ID N°11, correspondant à la séquence de l'insert obtenue au cours de la progression du séquençage. La séquence obtenue est présentée sur la séquence SEQ
20 ID NO1. La protéine ainsi identifiée a été désignée PAP1 (Parkin-Associated Protein 1).

La comparaison de la séquence de cet insert avec les séquences contenues dans les banques de données GENBank et EMBL (European Molecular Biology Lab) a montré une homologie de 25%, au niveau protéique, avec différents membres de la
25 famille des Synaptotagmines. Les Synaptotagmines font partie d'une famille de protéines membranaires codées par au moins onze gènes différents exprimés dans le cerveau et autres tissus. Elles contiennent un domaine transmembranaire unique et deux domaines régulés par le calcium appelés C₂. C'est dans ce domaine que l'on trouve l'homologie entre les Synaptotagmines et la protéine PAP1. Aucune autre
30 homologie significative n'a été observée.

EXEMPLE 5: ANALYSE DE LA SPECIFICITE D'INTERACTION ENTRE LA REGION CENTRALE DE LA PARKINE ET LA PROTEINE PAP1.

5 Afin de déterminer la spécificité d'interaction entre le fragment correspondant à la protéine PAP1 et la région centrale de la Parkine, un test d'interaction spécifique deux hybrides avec d'autres protéines non pertinentes a été réalisé. Pour réaliser ce test nous avons transformé la souche L40 par les plasmides de contrôle plex9-cAPP ou pLex9-HaRasVal12 à la place du plasmide pLex9-Parkin (135-290) codant
10 respectivement pour le domaine cytoplasmique de l'APP ou la protéine HaRasVal12 fusionnés au domaine de liaison à l'ADN de LexA et par le plasmide isolé lors du criblage de la banque deux hybrides. Un test d'activité β -Gal sur les cellules transformées par les différents plasmides a été effectué afin de déterminer une interaction protéine-protéine. D'après le résultat du test, seules les levures
15 transformées par le plasmide isolé lors du criblage de la banque deux hybrides et par le plasmide pLex9-Parkine (135-290) présentaient une activité β -Gal⁺ montrant ainsi une interaction entre la région centrale de la Parkine et la protéine PAP1. Cette interaction s'avère donc être spécifique puisque ce fragment de PAP1 ne semble pas interagir avec les protéines cAPP ou HaRasVal12.

20 Ces résultats montrent donc l'existence d'une protéine nouvelle, désignée PAP1, capable d'interagir de manière spécifique avec la Parkine. Cette protéine, apparentée aux synaptotagmines, ne présente aucune homologie significative avec des protéines connues, et peut être utilisée dans des applications thérapeutiques ou
25 diagnostiques, pour la production d'anticorps, de sondes ou peptides ou encore pour le screening de molécules actives.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbasi, N. *et al.* (1999). A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. *Hum Mol Genet.* 8, 567-574.
- Bartel, P.L. *et al.* (1993). D.A Hartley Ed, Oxford University press, 153
- Chung, CT. *et al.* (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 2172-2175.
- Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 340, 245-246.
- Gietz, RD. *et al.* (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.*, 20, 1425.
- Hattori, N. *et al.* (1998). Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals. *Ann Neurol.* 6, 935-941.
- Kahn, A. *et al.*, (1991) Thérapie génique : espoirs et limites. *Médecine et Sciences.* 7, 705-714.
- Kitada, T. *et al.* (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 392, 605-608.
- Leroy, E. *et al.* (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature.* 395, 451-452.
- Lewy, F.H. (1912). in *Handbuch der Neurologie* (Lewandowski, M., ed) pp 920 - 933, Springer, Berlin
- Lucking, C. *et al.* (1998). Homozygous deletions in parkin gene in European and North African families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Lancet.* 352, 1355-1356.
- Maniatis, T. *et al.* (1989). Molecular cloning, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.

- Morett, E. (1999). A novel transactivation domain in parkin. *Trends Biochem Sci.* **24**, 229-231.
- Peytavi, R. *et al.* (1999). HEED, the product of the human homolog of the murine *eed* gene, binds to the matrix protein of HIV-1. *J. Biol. Chem.* **274**, 1635-1645.
- 5 Polymeropoulos, M.H. *et al.* (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* **276**, 2045-2047.
- Sanger, F. *et al.* (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.
- 10 Shimura, H. *et al.* (1999). Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Ann Neurol.* **45**, 668-672.
- Sunada, Y. *et al.* (1998). Differential expression of the parkin gene in the human brain and peripheral leukocytes. *Neurosci Lett.* **254**, 180-182.
- 15 Vojtek, AB. *et al.*, (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell.* **74**, 205-214.

REVENDICATIONS

1. Composé capable de moduler, au moins partiellement, l'interaction entre la protéine PAP1 ou un homologue de celle-ci, et la Parkine.
- 5 2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il ralentit, inhibe ou stimule, au moins partiellement, ladite interaction.
3. Composé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est capable de lier le domaine d'interaction entre la protéine PAP1 ou un homologue de celle-ci, et la Parkine.
- 10 4. Composé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un composé de type peptidique, nucléique, lipidique, saccharidique ou d'un anticorps.
5. Composé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un composé peptidique comprenant tout ou partie de la séquence peptidique SEQ ID N°2
15 ou un de ses dérivés.
6. Composé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un composé peptidique comprenant une région dont la séquence correspond à tout ou une partie fonctionnelle du site d'interaction de la protéine PAP1 avec la Parkine.
7. Composé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un
20 composé peptidique dérivé de la protéine PAP1 (et/ou des formes homologues) portant une région effectrice rendue non fonctionnelle.
8. Polypeptide comprenant la séquence SEQ ID NO :2 ou un dérivé ou fragment de celle-ci.
9. Polypeptide selon la revendication 8, comprenant au moins 5 résidus
25 consécutifs de la séquence SEQ ID NO : 2, de préférence au moins 9, plus préférentiellement au moins 15.
10. Acide nucléique codant pour un composé peptidique selon l'une des revendications 4 à 9.

11. Acide nucléique selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence SEQ ID NO : 1 ou d'une séquence dérivée de celle-ci.

12. Acide nucléique codant pour un polypeptide selon la revendication 8.

5 13. Acide nucléique, notamment une sonde nucléotidique, capable d'hybrider avec un acide nucléique selon l'une des revendications 10 à 12 ou avec leur brin complémentaire.

14. Vecteur comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 10 à 13.

10 15. Virus recombinant défectif comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 10 à 13.

16. Anticorps ou fragment ou dérivé d'anticorps, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre un composé peptidique selon l'une des revendications 4 à 9.

15 17. Anticorps selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il reconnaît un polypeptide selon la revendication 9.

18. Composition pharmaceutique comprenant au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 9 ou un anticorps selon la revendication 16 ou 17.

20 19. Composé non peptidique ou un composé de nature non exclusivement peptidique susceptible de moduler, au moins partiellement, l'interaction de la protéine PAP1 ou un homologue de celle-ci, avec la Parkine.

20. Composé selon la revendication 19 caractérisé en ce que les motifs actifs d'un peptide selon l'une des revendications 5 à 7 ont été dupliqués avec une structure non peptidique ou de nature non exclusivement peptidique.

21. Composition pharmaceutique comprenant au moins un acide nucléique selon l'une des revendications 10 à 13 ou un vecteur selon la revendication 14.

22. Composition pharmaceutique comprenant un composé peptidique selon l'une des revendications 4 à 9.

5 23. Composition selon la revendication 20, 21 ou 22, destinée au traitement de pathologies neurodégénératives.

24. Procédé pour le screening ou la caractérisation de molécules actives, comprenant une étape de sélection de molécules capables de lier la séquence SEQ ID NO2 ou la séquence SEQ ID NO4, ou un fragment de celles-ci.

10 25. Procédé de production d'un composé peptidique selon l'une des revendications 4 à 9, comprenant la culture d'une cellule contenant un acide nucléique selon l'une des revendications 10 à 13 ou un vecteur selon la revendication 14, dans des conditions d'expression dudit acide nucléique, et la récupération du composé peptidique produit.

15

LISTE DE SEQUENCES

<110> AVENTIS PHARMA

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE M

<120> COMPOSES CAPABLES DE MODULER L'ACTIVITE DE LA PARKINE,
SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES ET UTILISATIONS

<130> PRJ00004

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1313

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1032)

<400> 1

cag aat ctc cca tcc agt ccg gca ccc agt acc ata ttc tct gga ggt 48
Gln Asn Leu Pro Ser Ser Pro Ala Pro Ser Thr Ile Phe Ser Gly Gly
1 5 10 15

ttt aga cac gga agt tta att agc att gac agc acc tgt aca gag atg 96
Phe Arg His Gly Ser Leu Ile Ser Ile Asp Ser Thr Cys Thr Glu Met
20 25 30

ggc aat ttt gac aat gct aat gtc act gga gaa ata gaa ttt gcc att 144
Gly Asn Phe Asp Asn Ala Asn Val Thr Gly Glu Ile Glu Phe Ala Ile
35 40 45

cat tat tgc ttc aaa acc cat tct tta gaa ata tgc atc aag gcc tgt 192
His Tyr Cys Phe Lys Thr His Ser Leu Glu Ile Cys Ile Lys Ala Cys
50 55 60

aag aac ctt gcc tat gga gaa gaa aag aag aaa aag tgc aat ccg tat 240
Lys Asn Leu Ala Tyr Gly Glu Glu Lys Lys Lys Lys Cys Asn Pro Tyr
65 70 75 80

gtg aag acc tac ctg ttg ccc gac aga tcc tcc cag gga aag cgc aag 288

Val	Lys	Thr	Tyr	Leu	Leu	Pro	Asp	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly	Lys	Arg	Lys		
				85					90					95			
act	gga	gtc	caa	agg	aac	acc	gtg	gac	ccg	acc	ttt	cag	gag	acc	ttg	336	
Thr	Gly	Val	Gln	Arg	Asn	Thr	Val	Asp	Pro	Thr	Phe	Gln	Glu	Thr	Leu		
			100					105					110				
aag	tat	cag	gtg	gcc	cct	gcc	cag	ctg	gtg	acc	cgg	cag	ctg	cag	gtc	384	
Lys	Tyr	Gln	Val	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu	Val	Thr	Arg	Gln	Leu	Gln	Val		
			115				120					125					
tcg	gtg	tgg	cat	ctg	ggc	acg	ctg	gcc	cgg	aga	gtg	ttt	ctt	gga	gaa	432	
Ser	Val	Trp	His	Leu	Gly	Thr	Leu	Ala	Arg	Arg	Val	Phe	Leu	Gly	Glu		
			130				135					140					
gtg	atc	att	tct	ctg	gcc	acg	tgg	gac	ttt	gaa	gac	agc	aca	aca	cag	480	
Val	Ile	Ile	Ser	Leu	Ala	Thr	Trp	Asp	Phe	Glu	Asp	Ser	Thr	Thr	Gln		
					145		150			155					160		
tcc	ttc	cgc	tgg	cat	ccg	ctc	cgg	gcc	aag	gcg	gag	aaa	tac	gaa	gac	528	
Ser	Phe	Arg	Trp	His	Pro	Leu	Arg	Ala	Lys	Ala	Glu	Lys	Tyr	Glu	Asp		
				165					170					175			
agc	gtt	cct	cag	agt	aat	gga	gag	ctc	aca	gtc	cgg	gct	aag	ctg	gtt	576	
Ser	Val	Pro	Gln	Ser	Asn	Gly	Glu	Leu	Thr	Val	Arg	Ala	Lys	Leu	Val		
				180				185					190				
ctc	cct	tca	cgg	ccc	aga	aaa	ctc	caa	gag	gct	caa	gaa	ggg	aca	gat	624	
Leu	Pro	Ser	Arg	Pro	Arg	Lys	Leu	Gln	Glu	Ala	Gln	Glu	Gly	Thr	Asp		
			195				200					205					
cag	cca	tca	ctt	cat	ggt	caa	ctt	tgt	ttg	gta	gtg	cta	gga	gcc	aag	672	
Gln	Pro	Ser	Leu	His	Gly	Gln	Leu	Cys	Leu	Val	Val	Leu	Gly	Ala	Lys		
			210				215					220					
aat	tta	cct	gtg	cgg	cca	gat	ggc	acc	ttg	aac	tca	ttt	gtt	aag	ggc	720	
Asn	Leu	Pro	Val	Arg	Pro	Asp	Gly	Thr	Leu	Asn	Ser	Phe	Val	Lys	Gly		
			225				230				235				240		
tgt	ctc	act	ctg	cca	gac	caa	caa	aaa	ctg	aga	ctg	aag	tcg	cca	gtc	768	
Cys	Leu	Thr	Leu	Pro	Asp	Gln	Gln	Lys	Leu	Arg	Leu	Lys	Ser	Pro	Val		
				245					250				255				
ctg	agg	aag	cag	gct	tgc	ccc	cag	tgg	aaa	cac	tca	ttt	gtc	ttc	agt	816	
Leu	Arg	Lys	Gln	Ala	Cys	Pro	Gln	Trp	Lys	His	Ser	Phe	Val	Phe	Ser		
				260				265					270				
ggc	gta	acc	cca	gct	cag	ctg	agg	cag	tcg	agc	ttg	gag	tta	act	gtc	864	

Gly Val Thr Pro Ala Gln Leu Arg Gln Ser Ser Leu Glu Leu Thr Val
 275 280 285
 tgg gat cag gcc ctc ttt gga atg aat gac cgc ttg ctt gga gga acc 912
 Trp Asp Gln Ala Leu Phe Gly Met Asn Asp Arg Leu Leu Gly Gly Thr
 290 295 300
 aga ctt ggt tca aag gga gac aca gct gtt ggc ggg gat gca tgc tca 960
 Arg Leu Gly Ser Lys Gly Asp Thr Ala Val Gly Gly Asp Ala Cys Ser
 305 310 315 320
 cta tcg aag ctc cag tgg cag aaa gtc ctt tcc agc ccc aat cta tgg 1008
 Leu Ser Lys Leu Gln Trp Gln Lys Val Leu Ser Ser Pro Asn Leu Trp
 325 330 335
 aca gac atg act ctt gtc ctg cac tgacatgaag gcctcaaggt tccaggttgc 1062
 Thr Asp Met Thr Leu Val Leu His
 340
 agcaggcgtg aggcactgtg cgtctgcaga ggggctacga accagggtgca ggggtcccagc 1122
 tggagacccc ttgaccttg agcagttctcc atctgcggcc ctgtcccatg gcttaaccgc 1182
 ctattggtat ctgtgtatat ttacgttaaa cacaattatg ttacctaagc ctctggtggg 1242
 ttatctcttc ttgagatgt agaaaatggc cagattttaa taaacgttgt tacccatgaa 1302
 aaaaaaaaaa a 1313

<210> 2

<211> 344

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Asn Leu Pro Ser Ser Pro Ala Pro Ser Thr Ile Phe Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 Phe Arg His Gly Ser Leu Ile Ser Ile Asp Ser Thr Cys Thr Glu Met
 20 25 30
 Gly Asn Phe Asp Asn Ala Asn Val Thr Gly Glu Ile Glu Phe Ala Ile
 35 40 45
 His Tyr Cys Phe Lys Thr His Ser Leu Glu Ile Cys Ile Lys Ala Cys
 50 55 60

Lys Asn Leu Ala Tyr Gly Glu Glu Lys Lys Lys Lys Cys Asn Pro Tyr
 65 70 75 80

Val Lys Thr Tyr Leu Leu Pro Asp Arg Ser Ser Gln Gly Lys Arg Lys
 85 90 95

Thr Gly Val Gln Arg Asn Thr Val Asp Pro Thr Phe Gln Glu Thr Leu
 100 105 110

Lys Tyr Gln Val Ala Pro Ala Gln Leu Val Thr Arg Gln Leu Gln Val
 115 120 125

Ser Val Trp His Leu Gly Thr Leu Ala Arg Arg Val Phe Leu Gly Glu
 130 135 140

Val Ile Ile Ser Leu Ala Thr Trp Asp Phe Glu Asp Ser Thr Thr Gln
 145 150 155 160

Ser Phe Arg Trp His Pro Leu Arg Ala Lys Ala Glu Lys Tyr Glu Asp
 165 170 175

Ser Val Pro Gln Ser Asn Gly Glu Leu Thr Val Arg Ala Lys Leu Val
 180 185 190

Leu Pro Ser Arg Pro Arg Lys Leu Gln Glu Ala Gln Glu Gly Thr Asp
 195 200 205

Gln Pro Ser Leu His Gly Gln Leu Cys Leu Val Val Leu Gly Ala Lys
 210 215 220

Asn Leu Pro Val Arg Pro Asp Gly Thr Leu Asn Ser Phe Val Lys Gly
 225 230 235 240

Cys Leu Thr Leu Pro Asp Gln Gln Lys Leu Arg Leu Lys Ser Pro Val
 245 250 255

Leu Arg Lys Gln Ala Cys Pro Gln Trp Lys His Ser Phe Val Phe Ser
 260 265 270

Gly Val Thr Pro Ala Gln Leu Arg Gln Ser Ser Leu Glu Leu Thr Val
 275 280 285

Trp Asp Gln Ala Leu Phe Gly Met Asn Asp Arg Leu Leu Gly Gly Thr
 290 295 300

Arg Leu Gly Ser Lys Gly Asp Thr Ala Val Gly Gly Asp Ala Cys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Lys Leu Gln Trp Gln Lys Val Leu Ser Ser Pro Asn Leu Trp
 325 330 335

Thr Asp Met Thr Leu Val Leu His
 340

<210> 3
 <211> 471
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(471)

<400> 3
 gga agt cca gca ggt aga tca atc tac aac agc ttt tat gtg tat tgc 48
 Gly Ser Pro Ala Gly Arg Ser Ile Tyr Asn Ser Phe Tyr Val Tyr Cys
 1 5 10 15
 aaa ggc ccc tgt caa aga gtg cag ccg gga aaa ctc agg gta cag tgc 96
 Lys Gly Pro Cys Gln Arg Val Gln Pro Gly Lys Leu Arg Val Gln Cys
 20 25 30
 agc acc tgc agg cag gca acg ctc acc ttg acc cag ggt cca tct tgc 144
 Ser Thr Cys Arg Gln Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Gly Pro Ser Cys
 35 40 45
 tgg gat gat gtt tta att cca aac cgg atg agt ggt gaa tgc caa tcc 192
 Trp Asp Asp Val Leu Ile Pro Asn Arg Met Ser Gly Glu Cys Gln Ser
 50 55 60
 cca cac tgc cct ggg act agt gca gaa ttt ttc ttt aaa tgt gga gca 240
 Pro His Cys Pro Gly Thr Ser Ala Glu Phe Phe Phe Lys Cys Gly Ala
 65 70 75 80
 cac ccc acc tct gac aag gaa aca tca gta gct ttg cac ctg atc gca 288
 His Pro Thr Ser Asp Lys Glu Thr Ser Val Ala Leu His Leu Ile Ala
 85 90 95
 aca aat agt cgg aac atc act tgc att acg tgc aca gac gtc agg agc 336
 Thr Asn Ser Arg Asn Ile Thr Cys Ile Thr Cys Thr Asp Val Arg Ser
 100 105 110
 ccc gtc ctg gtt ttc cag tgc aac tcc cgc cac gtg att tgc tta gac 384
 Pro Val Leu Val Phe Gln Cys Asn Ser Arg His Val Ile Cys Leu Asp

115

120

125

tgt ttc cac tta tac tgt gtg aca aga ctc aat gat cgg cag ttt gtt 432
 Cys Phe His Leu Tyr Cys Val Thr Arg Leu Asn Asp Arg Gln Phe Val
 130 135 140

cac gac cct caa ctt ggc tac tcc ctg cct tgt gtg tag 471
 His Asp Pro Gln Leu Gly Tyr Ser Leu Pro Cys Val
 145 150 155

<210> 4

<211> 156

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gly Ser Pro Ala Gly Arg Ser Ile Tyr Asn Ser Phe Tyr Val Tyr Cys
 1 5 10 15
 Lys Gly Pro Cys Gln Arg Val Gln Pro Gly Lys Leu Arg Val Gln Cys
 20 25 30
 Ser Thr Cys Arg Gln Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Gly Pro Ser Cys
 35 40 45
 Trp Asp Asp Val Leu Ile Pro Asn Arg Met Ser Gly Glu Cys Gln Ser
 50 55 60
 Pro His Cys Pro Gly Thr Ser Ala Glu Phe Phe Lys Cys Gly Ala
 65 70 75 80
 His Pro Thr Ser Asp Lys Glu Thr Ser Val Ala Leu His Leu Ile Ala
 85 90 95
 Thr Asn Ser Arg Asn Ile Thr Cys Ile Thr Cys Thr Asp Val Arg Ser
 100 105 110
 Pro Val Leu Val Phe Gln Cys Asn Ser Arg His Val Ile Cys Leu Asp
 115 120 125
 Cys Phe His Leu Tyr Cys Val Thr Arg Leu Asn Asp Arg Gln Phe Val
 130 135 140
 His Asp Pro Gln Leu Gly Tyr Ser Leu Pro Cys Val
 145 150 155

<210> 5

<211> 27

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
 artificielle:Oligonucleotide

<400> 5

ttaagaattc ggaagtccag caggtag

27

<210> 6

<211> 29

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucleotide

<400> 6

attaggatcc ctacacacaa ggcagggag

29

<210> 7

<211> 19

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucleotide

<400> 7

gcggtttggaa tcactacag

19

<210> 8

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucleotide

<400> 8

ggtctcggtg tggcatc

17

<210> 9

<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucleotide

<400> 9

ccgcttgctt ggaggaac

18

<210> 10

<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucleotide

<400> 10

cgtatttctc cgccttgg

18

<210> 11

<211> 28

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:Oligonucleotide

<400> 11

aatagctcga gtcagtgcag gacaagag

28

La présente invention résulte plus particulièrement de la mise en évidence par la demanderesse d'une nouvelle protéine humaine, désignée PAP1 (Parkine Associated Protein 1), interagissant avec la parkine. La protéine PAP1 (séquence SEQ ID NO :1 ou 2) présente une certaine homologie avec les synaptotagmines et est capable d'interagir plus particulièrement avec la région centrale de la parkine (représentée sur la séquence SEQ ID NO :3 ou 4).

La présente invention résulte également de l'identification et de la caractérisation de régions particulières de la protéine PAP1, impliquées dans la modulation de la fonction de la parkine. La mise en évidence de l'existence de cette protéine et de régions impliquées dans sa fonction permet notamment de préparer de nouveaux composés et/ou compositions utilisables comme agents pharmaceutiques et de développer des méthodes industrielles de criblage de tels composés.

Un premier objet de l'invention concerne donc des composés capables de moduler, au moins partiellement, l'interaction entre la protéine PAP1 (ou ses homologues) et la parkine (notamment la parkine humaine), ou d'interférer au niveau de l'interaction entre ces protéines.

Un autre objet de l'invention réside dans la protéine PAP1, ses fragments, dérivés et homologues.

Un autre aspect de l'invention réside dans un acide nucléique codant la protéine PAP1, ses fragments, dérivés ou homologues, ainsi que tout vecteur comprenant un tel acide nucléique et toute cellule recombinante contenant un tel acide nucléique ou vecteur.

L'invention concerne aussi des anticorps capables de lier la protéine PAP1, ses fragments, dérivés et homologues, notamment des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, plus préférentiellement des anticorps capables de lier la protéine PAP1 et d'inhiber au moins partiellement son interaction avec la parkine.

Un autre aspect de l'invention concerne des sondes ou amorces nucléotidiques, spécifiques de PAP1, utilisables pour détecter ou amplifier le gène de pap1 ou une région de celui-ci dans tout échantillon biologique.

central. En particulier, l'invention concerne l'utilisation de ces molécules pour moduler au moins partiellement l'activité de la Parkine.

L'invention concerne également un procédé pour le criblage ou la
5 caractérisation de molécules actives sur la fonction de la parkine, comprenant la
sélection de molécules capables de lier la séquence SEQ ID NO :2 ou la séquence
SEQ ID NO :4, ou un fragment (ou dérivé) de celles-ci. Le procédé comprend
avantageusement la mise en contact, in vitro, de la ou des molécules test avec un
polypeptide comprenant la séquence SEQ ID NO :2 ou la séquence SEQ ID NO :4,
10 ou un fragment (ou dérivé) de celles-ci, et la sélection de molécules capables de lier
la séquence SEQ ID NO :2 (notamment la région comprise entre les résidus 1 et 344)
ou la séquence SEQ ID NO :4. Les molécules testées peuvent être de nature variée
(peptide, nucléique, lipide, sucre, etc., ou des mélanges de telles molécules, par
exemple des bibliothèques combinatoires, etc.). Comme indiqué ci-avant, les
15 molécules ainsi identifiées peuvent être utilisées pour moduler l'activité de la
protéine Parkine, et représentent des agents thérapeutiques potentiels pour le
traitement de pathologies neurodégénératives.

D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des
20 exemples et figure qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non
limitatifs.

LEGENDES DE LA FIGURE :

25 Figure 1: Représentation du vecteur pLex9-Parkine (135-290)

MATERIELS ET TECHNIQUES MIS EN OEUVRE

1) Souches de levure:

EXEMPLE 5: ANALYSE DE LA SPECIFICITE D'INTERACTION ENTRE LA REGION CENTRALE DE LA PARKINE ET LA PROTEINE PAP1.

5 Afin de déterminer la spécificité d'interaction entre le fragment correspondant à la protéine PAP1 et la région centrale de la Parkine, un test d'interaction spécifique deux hybrides avec d'autres protéines non relevantes a été réalisé. Pour réaliser ce test nous avons transformé la souche L40 par les plasmides de contrôle pLex9-cAPP ou pLex9-HaRasVal12 à la place du plasmide pLex9-Parkin (135-290) codant
10 respectivement pour le domaine cytoplasmique de l'APP ou la protéine HaRasVal12 fusionnés au domaine le liaison à l'ADN de LexA et par le plasmide isolé lors du criblage de la banque deux hybrides. Un test d'activité β -Gal sur les cellules transformées par les différents plasmides a été effectué afin de déterminer une
15 interaction protéine-protéine. D'après le résultat du test, seules les levures transformées par le plasmide isolé lors du criblage de la banque deux hybrides et par le plasmide pLex9-Parkine (135-290) présentaient une activité β -Gal+ montrant ainsi une interaction entre la région centrale de la Parkine et la protéine PAP1. Cette interaction s'avère donc être spécifique puisque ce fragment de PAP1 ne semble pas interagir avec les protéines cAPP ou HaRasVal12.

20

 Ces résultats montrent donc l'existence d'une protéine nouvelle, désignée PAP1, capable d'interagir de manière spécifique avec la Parkine. Cette protéine, apparentée aux synaptotagmines, ne présente aucune homologie significative avec des protéines connues, et peut être utilisée dans des applications thérapeutiques ou
25 diagnostiques, pour la production d'anticorps, de sondes ou peptides ou encore pour le criblage de molécules actives.

11. Acide nucléique selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence SEQ ID NO : 1 ou d'une séquence dérivée de celle-ci.
12. Acide nucléique codant pour un polypeptide selon la revendication 8.
13. Acide nucléique, notamment une sonde nucléotidique, capable d'hybrider avec un acide nucléique selon l'une des revendications 10 à 12 ou avec leur brin complémentaire.
14. Vecteur comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 10 à 13.
15. Virus recombinant défectif comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 10 à 13.
16. Anticorps ou fragment ou dérivé d'anticorps, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre un composé peptidique selon l'une des revendications 4 à 9.
17. Anticorps selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il reconnaît un polypeptide selon la revendication 9.
18. Composition pharmaceutique comprenant au moins un composé ou un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 9 ou un anticorps selon la revendication 16 ou 17.
19. Composé non peptidique ou un composé de nature non exclusivement peptidique capable de moduler, au moins partiellement, l'interaction de la protéine PAP1 ou un homologue de celle-ci, avec la Parkine.
20. Composé selon la revendication 19 caractérisé en ce que les motifs actifs d'un peptide selon l'une des revendications 5 à 7 ont été dupliqués avec une structure non peptidique ou de nature non exclusivement peptidique.

21. Composition pharmaceutique comprenant au moins un acide nucléique selon l'une des revendications 10 à 13 ou un vecteur selon la revendication 14.

22. Composition pharmaceutique comprenant un composé peptidique selon l'une des revendications 4 à 9.

23. Composition selon l'une des revendications 21 et 22 destinée au traitement de pathologies neurodégénératives.

24. Procédé pour le screening ou la caractérisation de molécules actives, comprenant une étape de sélection de molécules capables de lier la séquence SEQ ID NO2 ou la séquence SEQ ID NO4, ou un fragment de celles-ci.

25. Procédé de production d'un composé peptidique selon l'une des revendications 4 à 9, comprenant la culture d'une cellule contenant un acide nucléique selon l'une des revendications 10 à 13 ou un vecteur selon la revendication 14, dans des conditions d'expression dudit acide nucléique, et la récupération du composé peptidique produit.

21. Composition pharmaceutique comprenant au moins un acide nucléique selon l'une des revendications 10 à 13 ou un vecteur selon la revendication 14.

22. Composition pharmaceutique comprenant un composé peptidique selon l'une des revendications 4 à 9.

5 23. Composition selon la revendication 20, 21 ou 22, destinée au traitement de pathologies neurodégénératives.

24. Procédé pour le criblage ou la caractérisation de molécules actives, comprenant une étape de sélection de molécules capables de lier la séquence SEQ ID NO2 ou la séquence SEQ ID NO4, ou un fragment de celles-ci.

10 25. Procédé de production d'un composé peptidique selon l'une des revendications 4 à 9, comprenant la culture d'une cellule contenant un acide nucléique selon l'une des revendications 10 à 13 ou un vecteur selon la revendication 14, dans des conditions d'expression dudit acide nucléique, et la récupération du composé peptidique produit.

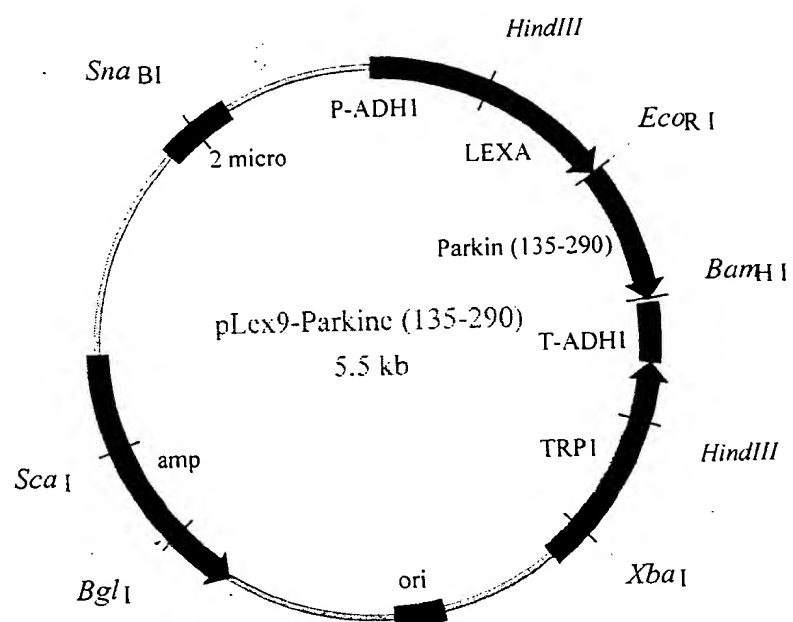


FIGURE 1

ORIGINAL